

圧による血管平滑筋細胞の遊走能への影響

著者	角道 紀子
号	2064
発行年	2004
URL	http://hdl.handle.net/10097/22609

氏 名 (本籍) ^{かく}角 ^{どう}道 ^{のり}紀 ^こ子

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学位記番号 医博第 2064 号

学位授与年月日 平成 16 年 3 月 25 日

学位授与の条件 学位規則第4条第1項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院医学系研究科
 (博士課程) 医科学専攻

学位論文題目 The Influence of Increased Static Pressure on
Vascular Smooth Muscle Cell Migration
(圧による血管平滑筋細胞の遊走能への影響)

(主 查)

論文審査委員 教授 白土邦男 教授 佐藤靖史

教授 田 林 暘 一

論文内容要旨

背景

動脈硬化の危険因子には高血圧、高コレステロール血症、糖尿病、シェアーストレス、免疫複合体、酸化ストレス、喫煙などが挙げられるが、動脈硬化の発症機序として、傷害反応説が最も知られている。すなわち、危険因子により血管内皮細胞に傷害が起こると、内皮細胞の性質が変化し、その表面に接着分子の発現が増える。接着分子を介してマクロファージ、Tリンパ球、血小板、内皮細胞などが活性化され、これらの細胞はPDGFをはじめとするさまざまな増殖因子やサイトカインを放出し、平滑筋細胞の遊走と増殖を促進する。平滑筋細胞は自らも増殖因子やサイトカインを分泌する。これら一連の反応は血管壁に起きた一種の炎症であり、動脈硬化の病因と考えられている。

研究目的

血管平滑筋細胞の中膜から内膜への遊走は、動脈硬化や血管形成術などに伴う血管病変を形成する因子として重要である。高血圧は動脈硬化の危険因子の一つであり、血圧上昇により血管増殖、リモデリングが起こると考えられているが、圧負荷が平滑筋細胞の遊走能に直接関与しているかどうか不明である。今回ラットの培養平滑筋細胞における遊走能に対する、圧負荷の影響を調べた。

研究方法

ラットの血管平滑筋細胞をフィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、またはIV型コラーゲンでコーティングしたプレート上で培養し、90 mmHg, 180 mmHg の圧負荷を加えた。平滑筋細胞の遊走能は monolayer-wounding cell migration assay と Boyden-chamber assay にて評価した。次に、インテグリンの $\beta 1$ と $\beta 3$ に対する中和抗体を用いて、圧負荷により亢進した平滑筋細胞の遊走能が抑制されるかどうか観察した。また、圧負荷前と、負荷後の平滑筋細胞の $\beta 1$ と $\beta 3$ インテグリンの発現量をフローサイトメトリーにて測定した。

研究結果

monolayer-wounding cell assay では、フィブロネクチン上で培養した平滑筋細胞（コントロール群に対して 180 mmHg 群 = 11.3 ± 3.4 倍 (p 値 < 0.05), 90 mmHg 群 = 2.1 ± 0.41 倍, n = 5) と、ビトロネクチン上で培養した平滑筋細胞（180 mmHg 群 = 10.6 ± 0.68 倍 (p 値 < 0.05), 90 mmHg 群 = 5.2 ± 1.9 倍, n = 5) において、180 mmHg の圧負荷 72 時間後、有意に遊走能が

亢進していた。Boyden-chamber assay では、遊走した平滑筋細胞の数は、フィブロネクチン上で培養した平滑筋細胞（180 mmHg 群 = 8.6 ± 2.2 倍（ p 値 < 0.05 ），90 mmHg 群 = 1.8 ± 0.43 倍， $n=5$ ）と、ビトロネクチン上で培養した平滑筋細胞（180 mmHg 群 = 8.2 ± 1.9 倍（ p 値 < 0.05 ），90 mmHg 群 = 3.1 ± 1.2 倍， $n=5$ ）において，180 mmHg の圧負荷 12 時間後，有意に遊走能が亢進していた。ラミニン上で培養した平滑筋細胞と，IV型コラーゲン上で培養した平滑筋細胞においては，圧負荷後，有意な遊走能の亢進は認められなかった。また，圧負荷によって亢進した平滑筋細胞の遊走は，インテグリン $\beta 1$ に対する中和抗体によって，有意に抑制され（コントロール群に対してフィブロネクチン群 = $3.8 \pm 2.3\%$ ，ビトロネクチン群 = $4.2 \pm 4.2\%$ ， p 値 < 0.01 ）， $\beta 3$ に対する中和抗体によっても，有意に抑制された（フィブロネクチン群 = $8.9 \pm 2.7\%$ ，ビトロネクチン群 = $37.8 \pm 5.7\%$ ， p 値 < 0.01 ）。圧負荷後の平滑筋細胞における $\beta 1$ と $\beta 3$ インテグリンの発現量は，負荷前と比較して有意な変化は認められなかった。

考 察

平滑筋細胞の遊走能は，monolayer-wounding cell assay と Boyden-chamber assay にて評価したところ，直接，圧負荷によって亢進していた。遊走能の亢進は，フィブロネクチン，ビトロネクチンにおいて認められたが，ラミニン，IV型コラーゲンでは認められなかった。また，平滑筋細胞の遊走能はインテグリン $\beta 1$ ， $\beta 3$ に対する中和抗体によって抑制されたが， $\beta 1$ ， $\beta 3$ の蛋白発現量は変化していなかった。

生体内では，血管壁はさまざまな因子によって修飾され，動脈硬化が進行するが，今回の実験より，圧負荷そのものもまた平滑筋細胞の遊走能を亢進し，動脈硬化の発生，進展に関与していることが示唆された。

結 論

高血圧により，平滑筋細胞の遊走能が亢進され，動脈硬化につながる可能性がある。このため，血圧を正常域に保つことは動脈硬化を予防するために，非常に重要である。インテグリン $\beta 1$ ， $\beta 3$ に対する中和抗体によって平滑筋細胞の遊走が抑制されたことにより，高血圧による動脈硬化の形成にインテグリン $\beta 1$ および $\beta 3$ が深く関与していることが示唆される。

審 査 結 果 の 要 旨

高血圧が動脈硬化の危険因子の一つであることは、数多くの臨床研究にて証明されている。動脈硬化発症の第一段階として、血管平滑筋細胞の中膜から内膜への遊走は、重要なステップであるが、生体内ではマクロファージ、Tリンパ球、血小板、内皮細胞など、さまざまな炎症性細胞や液性因子が関わっており、圧負荷自身が平滑筋細胞の遊走能に直接関与しているかどうか不明であった。

本論文では、ラットの平滑筋細胞を培養し、static pressure が及ぼす平滑筋細胞の遊走能の変化を、monolayer-wounding cell migration assay と Boyden chamber assay を用いて評価した。血管壁を形成する細胞外マトリックスとして、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、IV型コラーゲンを用い、いずれの細胞外マトリックスが、平滑筋細胞の遊走と関与しているか検討した。また平滑筋細胞膜上に存在する、細胞外マトリックスの受容体であるインテグリンの $\beta 1$ と $\beta 3$ に対する中和抗体を用いて、圧による平滑筋細胞の遊走能が抑制されるかどうか検討し、さらに圧負荷前と圧負荷後のインテグリン $\beta 1$ と $\beta 3$ の蛋白量の変化について、フローサイトメトリーにて検討した。

結果として、90 mmHg と 180 mmHg の圧負荷を培養平滑筋細胞に加えたところ、monolayer-wounding cell migration assay では 180 mmHg の圧負荷 72 時間後、平滑筋細胞の有意な遊走能の亢進が認められた。90 mmHg の圧負荷によっては平滑筋細胞の遊走能亢進は認められなかった。Boyden chamber assay においては、180 mmHg の圧負荷 12 時間後、平滑筋細胞の有意な遊走能の亢進が認められたが、90 mmHg の圧負荷によっては平滑筋細胞の遊走能亢進は認められなかった。細胞外マトリックスの中では、フィブロネクチンとビトロネクチンが、圧負荷による平滑筋細胞の遊走能亢進に関与していたが、ラミニンとIV型コラーゲンにおいては、圧負荷時の血管平滑筋細胞の遊走能の有意な亢進は認められなかった。また、インテグリン $\beta 1$ と $\beta 3$ に対する中和抗体によって、圧による平滑筋細胞の遊走能は抑制されていたが、インテグリン $\beta 1$ と $\beta 3$ の発現量は圧負荷によって変化しなかった。

本研究により、圧そのものが平滑筋細胞の遊走能を亢進させること、インテグリン $\beta 1$ と $\beta 3$ が圧負荷による平滑筋細胞の遊走能と深く関与していることが初めて示された。これは高血圧による動脈硬化形成の一つの機序を解明する上で非常に意義のある研究結果であり、動脈硬化の進展や、血管形成後の再狭窄を予防する上で、今後、更に発展が期待できるデータである。よって本論文は学位に値する。